

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

(51) Classification internationale des brevets 5 :  A61K 39/095 // C07K 13/00		A1	(11) Numér de publicati n internationale: WO 93/06861  (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale:	PCT/FR92/00905		
(22) Date de dépôt international:	29 septembre 1992 (29.09.92)		
(30) Données relatives à la priorité: 91/12177	3 octobre 1991 (03.10.91)	FR	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).			(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(72) Inventeur; et			
(75) Inventeur/Déposant ( <i>US seulement</i> ): QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR).			
(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: VACCINE FOR *NEISSERIA MENINGITIDIS* INFECTIONS

(54) Titre: VACCIN CONTRE LES INFECTIONS A NEISSERIA MENINGITIDIS

## (57) Abstract

A pharmaceutical vaccine composition including at least a first and a second human transferrin-binding molecules as therapeutic agents, wherein said first molecule originates from a first *N. meningitidis* strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by an anti-receptor antiserum of *N. meningitidis* strain 2394 (receptor 2394) but not by an anti-receptor antiserum of *N. meningitidis* strain 2169 (receptor 2169); and at least one second molecule originating from a second *N. meningitidis* strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by a 2169 anti-receptor antiserum but not by a 2394 anti-receptor antiserum.

**(57) Abrégé**

Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169); et au moins une deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TG	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

## Vaccin contre les infections à *Neisseria meningitidis*

5 La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention des méningites causées par *Neisseria meningitidis*.

10 D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

15 On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

20 L'espèce *N. meningitidis* est sub-divisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

25 Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

30 Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparaît hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du sérogroupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

35 A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir des protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligeable chez l'homme (de l'ordre de :  $10^{-18}$  M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kD, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

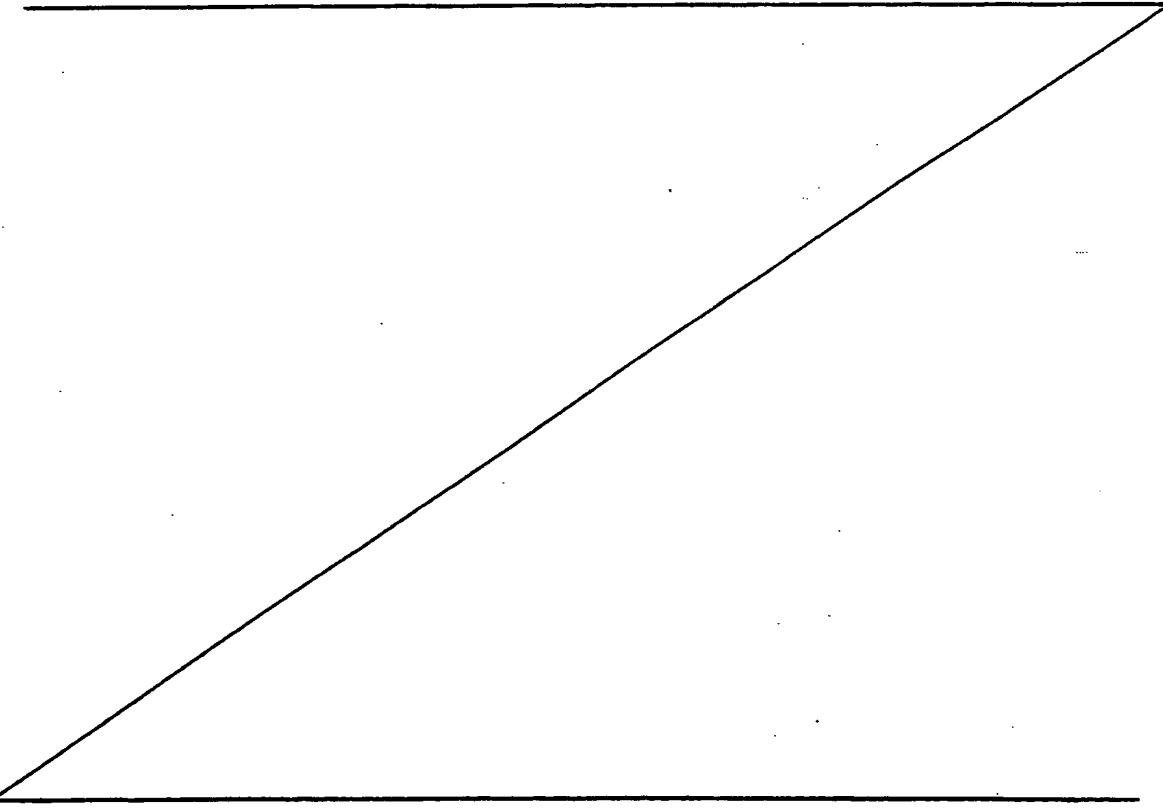
Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est appelé, par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant, des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

On a maintenant trouvé qu'il existait au moins 2 types de souches qui diffèrent par la constitution de leurs récepteurs de la transferrine respectifs. Ceci a été mis en évidence en étudiant des extraits membranaires de plusieurs dizaines de souches de *N. meningitidis* d'origines variées. Ces extraits membranaires ont tout d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, puis électrotransferés sur feuilles de nitrocellulose. Ces feuilles de nitrocellulose ont été incubées :

- a) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* B16B6, aussi appellée 2394 ;
- 5 b) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* 2169 ; ou
- c) en présence de la transferrine humaine conjuguée à la peroxydase.
- 10 En ce qui concerne a) et b), la reconnaissance des sous-unités du récepteur de la transferrine est révélée par addition d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, puis par addition du substrat de cette enzyme.

15 Les tableaux I et II ci-après dessous indiquent le profil de certaines souches représentatives tel qu'il apparaît sur gel de SDS-PAGE à 7,5 % polyacrylamide ; les bandes sont caractérisées par leur poids moléculaire apparent exprimé en kilodaltons (kD) :

---



		<b>Souches</b>		
<b>Tableau I</b>		2394 (B; 2a;P1.2:L2.3) 2228 (B; nd) 2170 (B; 2a;P1.2:L3)	2234 (Y;nd) 2154 (C; nd) 2448 (B; nd)	550 (C; 2a; 179 (C; 2a;P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394		93 68	93 69	99 69
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169		93	93	99
Détection avec la transférine peroxydase		68	69	69

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérogroupe, le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

		Souches								
Tableau II		2169 (B:9:P1.9)	1000 (B:nd)	1604 (B:nd)	132 (C:15:P1.16)	1001 (A:4:P1.9)	876 (B:19:P1.6)	1951 (A:nd)	2449 (B:nd)	867 (B:2b:P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394		96	98	98	98	98	96	94	94	93
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169		96	98	98	98	98	96	94	94	93
Détection avec la transférine-peroxydase		87	85	83	81	79	88	87	85	85

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérogroupe, le sérotyp, le sous-type et l'immunotype.

Les résultats répertoriés dans les 2 premières lignes des tableaux montrent qu'il existe 2 types de souches :

5 Le premier type (Tableau I) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2394 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2169.

10 Le second type (Tableau II) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2169 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2394.

15 En conséquence, il existe une diversité antigénique au niveau de la sous-unité de moindre poids moléculaire. Cette diversité est toutefois restreinte puisqu'elle se résout en 2 grands types, contrairement à ce qui est suggéré par Griffiths et al, FEMS Microbiol. Lett. (1990) 69 : 31.

20 [Par ailleurs, on notera que quelque soit le type de souche, la sous-unité capable de se lier à la transferrine est toujours la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tableaux A et B, troisième ligne des résultats).]

25 En vertu de ces constatations, il eut été tentant de conclure qu'un vaccin efficace à l'encontre de toutes les infections à *N. meningitidis* pouvait être constitué de manière suffisante, d'un récepteur de la transferrine ou uniquement de sa sous-unité de haut poids moléculaire, quelle que soit la souche d'origine du récepteur, puisque cette dernière est reconnue par les 2 types d'antisérum.

30 De manière surprenante, on a maintenant trouvé que tel n'était pas le cas dans la mesure où la sous-unité de haut poids moléculaire ne serait pas capable d'induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction. Puisque cette sous-unité de moindre poids moléculaire se caractérise par une variation antigénique significative du premier type au deuxième type de souche, un seul type de récepteur de la transferrine ne devrait pas être suffisant pour vacciner contre toutes les infections à *N. meningitidis*.

C'est pourquoi l'invention propose :

- i) Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ;
- ii) Un kit de vaccination contenant :
  - a) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une première molécule capable de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ;
  - b) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine ; ladite deuxième molécule ayant pour

5 origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394. ; et

- 10 c) Des instructions pour l'administration concomitante ou consécutive des compositions a) et b) ;
- 15 iii) L'usage thérapeutique combiné d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et
- 20 iv) Une méthode de vaccination à l'encontre des infections à *N. meningitidis*, qui comprend l'acte d'administrer une quantité efficace d'un point de vue thérapeutique d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine, de manière concomitante ou consécutive, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement vaccinal ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la
- 25
- 30
- 35

souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.

10

Par "molécule capable de se lier à la transferrine humaine", on entend soit un récepteur de la transferrine humaine ayant pour origine *N. meningitidis* (c'est-à-dire une molécule comprenant notamment 2 types de sous-unités) soit uniquement la sous-unité du récepteur, capable de se lier à la transferrine humaine, ainsi qu'un fragment ou un analogue de cette sous-unité.

20

Un récepteur de la transferrine peut être obtenu sous forme purifiée à partir d'une souche de *N. meningitidis* préalablement cultivée dans un milieu carencé en fer sous forme libre, notamment selon la méthode de Schryvers et al, WO 90/12591, décrite de manière similaire dans Schryvers et al, Infect. Immun. (1988) 56 (5) : 1144. De manière alternative, un récepteur de la transferrine ayant pour origine une souche de *N. meningitidis* peut être produit en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique. Le ou les fragments d'ADN codant pour les sous-unités du récepteur peuvent être exprimés conjointement ou séparément dans un système d'expression hétérologue (e.g. bactérie, levure, cellule de mammifère). Les sous-unités sous forme libre ou associées sous forme de récepteur sont dans ce cas-là recueillies à partir d'une culture et purifiées. Lorsque les sous-unités sont ainsi produites sous forme libre, on peut prévoir de les réassocier sous forme de récepteur en les soumettant à un traitement approprié.

30

La sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine (sous-unité de moindre poids moléculaire) peut être obtenue sous forme purifiée (c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire) notamment à partir d'un récepteur purifié selon la méthode de Schryvers et al, en soumettant le récepteur à l'action d'un agent fortement dénaturant tel que l'urée 8M ou la guanidine HCl 6M, puis en séparant les sous-unités dissociées par des méthodes

chromatographiques classiques telles qu'une chromatographie d'échange d'ions ou de gel de filtration. De manière alternative, la sous-unité peut être produite selon les méthodes du génie génétique. Ces méthodes sont en outre parfaitement adaptées à la production des fragments ou des analogues de la sous-unité.

5

A titre d'exemple, les sous-unités Tbp1 et Tbp2 des souches 2394 et 2169 sont décrites par référence à leurs séquences d'acides aminés telles que montrées dans les identificateurs de séquences n° 1 à 4 (SEQ ID N° 1 à 4).

10

15

Par "fragment de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie un peptide ayant une séquence d'acides aminés qui est incluse dans la séquence de la sous-unité. Par "anologue de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie une protéine ayant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 95 % avec la séquence de la sous-unité. Aux fins de la présente invention, il est bien entendu qu'un tel fragment ou un tel analogue doit conserver les propriétés immunogènes de la sous-unité.

20

25

Les souches de *N. meningitidis* 2394 (B:2a:P1.2:L2.3) et 2169 (B:9:P1.9:L3.7), communément utilisées dans les laboratoires, sont publiquement disponibles auprès de la Collection de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs CIP 7908 et CIP 7917.

De plus, les antisérum anti-récepteur qui sont requis afin de discriminer les souches de *N. meningitidis* peuvent être obtenus comme suit :

30

35

Un récepteur est tout d'abord purifié à partir d'une souche initiale (2394 ou 2169), selon la méthode de Schryvers et al. Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 µg du récepteur en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 µg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm. Le filtrat est par la suite épuisé par contact

avec la souche initiale qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à  $10^{10}$  cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

10       Le type d'une souche (vis-à-vis de la nature de son récepteur de la transferrine) peut être identifié à partir d'extraits membranaires derivés de cultures carencées en fer sous forme libre, en mettant en oeuvre des techniques conventionnelles telles que l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, poursuivie par un immunoblotting utilisant un antisérum tel que précédemment décrit.

15       La première molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 93-95 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 75 à 60 kD, de préférence de 72 à 65 kD, et de manière tout à fait préférée respectivement (i) de 93 kD et (ii) de 67-70 kD environ.

25       La deuxième molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 100 à 95 kD, de manière tout à fait préférée de 98 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 90 à 80 kD, de préférence de 87 à 85 kD, de manière tout à fait préférée de 87 kD environ.

30       Les poids moléculaires indiqués ci-avant sont des poids moléculaires apparents tels que révélés après électrophorèse d'un récepteur purifié sur gel de SDS-PAGE. Une telle électrophorèse peut être mise en oeuvre selon la méthode de Laemmli illustrée comme suit :

On prépare tout d'abord un gel de polyacrylamide (16 cm x 20 cm x 1 mm d'épaisseur) comprenant un prégel à 5 % et un gel séparateur à 7,5 % dans du tampon d'électrophorèse (Tris 6 g/l, glycine 28,8 g/l, SDS 0,1 %).

5        D'autre part, à 50 µl d'une solution de récepteur purifié à 0,6 mg/ml (dans le tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl à 0,05 %) sont ajoutés 50 µl de tampon échantillon (Tris-HCl 62 mM pH 6.8, SDS 2 %, β-mercaptopéthanol 5 %, glycérol 1 %, bleu de bromophénol 0,001 %). Le mélange est incubé pendant 5 min dans un bain d'eau en ébullition. 17 µl (soit 5 µg de protéine) de l'échantillon ainsi préparé sont déposés dans un puits du gel. On ajoute en parallèle, un échantillon préparé de manière similaire qui contient des marqueurs de poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée en tampon d'électrophorèse à 50 Volts pendant 15 heures. Le gel est fixé et coloré au bleu de Coomassie.

15      D'une manière générale, la première ou la deuxième molécule utile aux fins de la présente invention peut avoir pour origine une souche de *N. meningitidis* de n'importe quel sérogroupe. De manière avantageuse, la première ou la deuxième molécule a pour origine une souche de *N. meningitidis* sérogroupe B. De préférence, la première et la deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et une deuxième souches de *N. meningitidis* sérogroupe B.

25      Selon un aspect de l'invention tout à fait préféré, la première molécule a pour origine la souche 2394 tandis que la deuxième molécule a pour origine la souche 2169.

30      Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe le ou les agents thérapeutiques selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intramusculaire ou par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension injectable. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou

plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

- 5 L'invention est décrite plus en détails dans les exemples ci-après et par référence à la Figure 1, qui représente une électrophorèse en gel SDS-PAGE en polyacrylamide 7,5 % dans laquelle les colonnes A et B correspondent aux récepteurs des souches *N. meningitidis* 2169 et 2394, respectivement. Les flèches à l'horizontale indiquent l'emplacement des protéines témoins de masse moléculaire apparente connue (94 kD, phosphorilase B ; 67 kD, albumine).
- 10

EXEMPLE 1: Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2394

1A - Culture

5

Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* 2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Muller-Hinton contenant du sang cuit (5 %).

10

Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO<sub>2</sub>, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemencer 150 ml de BMH pH 7,2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémentés avec 30 µm d'éthylènediamine - di (O-hydroxyphenyl - acetic acid) (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

20

Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

1B - Purification

25

La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

30

Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg.

35

Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

5 A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotynylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé 10 pendant 60 min à température ambiante.

15 Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de N Lauroyl Sarkosine à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM respectivement. Après une incubation de 15 min à 37°C sous agitation, on ajoute 1 ml de résine streptavidine agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée 15 min à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon B 25 contenant de la guanidine HCl 2M Sarkosyl 0,05 %. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à 1 Vol., dans des tubes contenant 1 Vol. de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

30 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la 35 solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

5

EXEMPLE 2 : Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2169.

10 La culture de la souche 2169 et la purification du récepteur de la transferrine sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

15 EXEMPLE 3 : Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

Les solutions stériles obtenues dans les Exemples 1 et 2 sont décongelées. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 100 µg/ml de chacun des principes actifs, on mélange stérilement les solutions suivantes :

20

- Solution de récepteur 2394 à 1 mg/ml dans du tampon C 100 ml

25

- Solution de récepteur 2169 à 1 mg/ml dans du tampon C 100 ml

- Eau physiologique tamponnée (PBS) à pH 6.0 300 ml

30

- Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al<sup>+++</sup>/ml 50 ml

- Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS 10 ml

- PBS qsp 1000 ml

35

**EXEMPLE 4 : Mise en évidence de l'importance de la sous-unité de moindre poids moléculaire à titre d'agent vaccinal.**

- Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 µg du récepteur 2394 ou 2169 (tel que obtenu dans l'Exemple 1 ou 2) en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 µg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum de animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm. Le filtrat est par la suite épuisé par contact avec la souche initiale (2394 ou 2169) qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer sous forme libre (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à  $10^{10}$  cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.
- Une gamme de dilution de chacun des antisérum anti-récepteur 2394 et anti-récepteur 2169 est préparée en milieu M199 (Gibco). 200 µl de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une macroplaqué de titrage (8x12in.). Un essai témoin est réalisé avec 200 µl de milieu M199. Dans chacun des puits on ajoute (i) 100 µl d'une culture en phase de croissance exponentielle d'une souche de *N. meningitidis*, en milieu Mueller-Hinton complémenté à 30 µM EDDA et (ii) 100 µl de complément (sérum de jeune lapin dilué).

Après 30 min d'incubation à 37°C sous agitation douce, on ajoute dans chaque puits, 1 ml de milieu Mueller-Hinton contenant 1 ml d'agar noble en surfusion. Après solidification du milieu, l'incubation est poursuivie 18-24 hrs à 37°C ; puis le nombre d'unités formant des colonies dans chaque puits est évalué. L'inverse de la dernière dilution d'antisérum en présence de laquelle on observe 50 % de lyse par rapport au témoin, correspond au titre bactéricide.

Les résultats sont présentés dans le Tableau III ci-dessous :

Activité Bactéricide					
	Lapin n° 1		Lapin n° 2		
	Sérum avant immunisation	Antisérum anti-récepteur 2394	Sérum avant immunisation	Antisérum anti-récepteur 2169	
5	2394	< 8	2048	< 8	< 8
	2228	< 8	1024	< 8	< 8
	2154	< 8	2048	< 8	< 8
	2234	< 8	2048	< 8	< 8
	2448	< 8	256	< 8	< 4
	2169	< 16	< 16	< 8	1024
	896	< 8	< 8	< 8	65

L'antisérum anti-récepteur 2394 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du premier type tel que défini dans la présente demande (2394, 2228, 2154, 2234 et 2448) tandis que l'antisérum anti-récepteur 2169 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du second type (2169 et 876). Ceci suggère fortement que la production d'anticorps neutralisants est essentiellement induite par la sous-unité de moindre poids moléculaire qui porte la variabilité antigénique.

SEQ ID NO : 1

**Objet :** Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 *N. meningitidis* 2394.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Thr
1				5					10				15	
Val	Gln	Asp	Met	His	Ser	Lys	Pro	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Lys	Ser
				20					25				30	
Gln	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Asp	Val	Ser	Glu	Asn	Ser	Gly	Ala	Ala
				35				40				45		
Tyr	Gly	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Pro	Arg	Arg	Asn	Ala	His	Phe	Asn
				50				55				60		
Pro	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Asp	Trp
				65				70				75		
Lys	Lys	Leu	Gln	Arg	Gly	Glu	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Arg	Asp
				80				85				90		
Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	Lys
				95				100				105		
Trp	Glu	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Thr
				110				115				120		
Tyr	Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Asn	Ile	Asp	
				125				130				135		
Ile	Lys	Asn	Asn	Ile	Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr
				140				145				150		
Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile
				155				160				165		
Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Glu	Lys
				170				175				180		
Gln	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ser
				185				190				195		
Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Ala	
				200				205				210		
Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Phe
				215				220				225		
Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg
				230				235				240		
Asn	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Lys	Gln	Ile	Lys
				245				250				255		

Thr Thr Arg Tyr Thr Ile Gln Ala THr Leu His Gly Asn Arg Phe  
 260 265 270  
 Lys Gly Lys Ala Leu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Thr Asn Gly Ser  
 275 280 285  
 His Pro Phe Ile Ser Asp Ser Asp Ser Leu Glu Gly Gly Phe Tyr  
 290 295 300  
 Gly Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ala Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp  
 305 310 315  
 Asn Lys Val Ala Ala Val Phe Gly Ala Lys Gln Lys Asp Lys Lys  
 320 325 330  
 Asp Gly Glu Asn Ala Ala Gly Pro Ala Thr Glu Thr Val Ile Asp  
 335 340 345  
 Ala Tyr Arg Ile Thr Gly Glu Glu Phe Lys Lys Glu Gln Ile Asp  
 350 355 360  
 Ser Phe Gly Asp Val Lys Lys Leu Leu Val Asp Gly Val Glu Leu  
 365 370 375  
 Ser Leu Leu Pro Ser Glu Gly Asn Lys Ala Ala Phe Gln His Glu  
 380 385 390  
 Ile Glu Gln Asn Gly Val Lys Ala Thr Val Cys Cys Ser Asn Leu  
 395 400 405  
 Asp Tyr Met Ser Phe Gly Lys Leu Ser Lys Gku Asn Lys Asp Asp  
 410 415 420  
 Met Phe Leu Gln Gly Val Arg Thr Pro Val Ser Asp Val Ala Ala  
 425 430 435  
 Arg Thr Glu Ala Lys Tyr Arg Gly Thr Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr  
 440 445 450  
 Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Glu Ala Ser Asn Gln Glu  
 455 460 465  
 Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Asp Val Asp Phe Ser Thr Lys Lys  
 470 475 480  
 Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Asp Arg Thr Ser Pro Ala Phe  
 485 490 495  
 Thr Ile Thr Ala Met Ile Lys Asp Asn Gly Phe Ser Gly Val Ala  
 500 505 510  
 Lys Thr Gly Glu Asn Gly Phe Ala Leu Asp Pro Gln Asn Thr Gly  
 515 520 525  
 Asn Ser His Tyr Thr His Ile Glu Ala Thr Val Ser Gly Gly Phe  
 530 535 540  
 Tyr Gly Lys Asn Ala Ile Glu Met Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro  
 545 550 555  
 Gly Asn Ala Pro Glu Gly Lys Gln Glu Lys Ala Ser Val Val Phe  
 560 565 570  
 Gly Ala Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln  
 575

SEQ ID NO : 2

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp1 de *N. meningitidis* 2394.

Glu	Asn	Val	Gln	Ala	Glu
1					5
Gln Ala Gln Glu Lys Gln Leu Asp Thr Ile Gln Val Lys Ala Lys					
10		15			20
Lys Gln Lys Thr Arg Arg Asp Asn Glu Val Thr Gly Leu Gly Lys					
25		30			35
Leu Val Lys Ser Ser Asp Thr Leu Ser Lys Glu Gln Val Leu Asn					
40		45			50
Ile Arg Asp Leu Thr Arg Tyr Asp Pro Gly Ile Ala Val Val Glu					
55		60			65
Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Ser Ile Arg Gly Met Asp					
70		75			80
Lys Asn Arg Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Val Ser Gln Ile Gln					
85		90			95
Ser Tyr Thr Ala Gln Ala Ala Leu Gly Gly Thr Arg Thr Ala Gly					
100		105			110
Ser Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Asn Val Lys Ala					
115		120			125
Val Glu Ile Ser Lys Gly Ser Asn Ser Ser Glu Tyr Gly Asn Gly					
130		135			140
Ala Leu Ala Gly Ser Val Ala Phe Gln Thr Lys Thr Ala Ala Asp					
145		150			155
Ile Ile Gly Glu Gly Lys Gln Trp Gly Ile Gln Ser Lys Thr Ala					
160		165			170
Tyr Ser Gly Lys Asp His Ala Leu Thr Gln Ser Leu Ala Leu Ala					
175		180			185
Gly Arg Ser Gly Gly Ala Glu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Lys Arg					
190		195			200
Arg Gly Arg Glu Ile His Ala His Lys Asp Ala Gly Lys Gly Val					
205		210			215
Gln Ser Phe Asn Arg Leu Val Leu Asp Glu Asp Lys Lys Glu Gly					
220		225			230
Gly Ser Gln Tyr Arg Tyr Phe Ile Val Glu Glu Cys His Asn					
235		240			245
Gly Tyr Ala Ala Cys Lys Asn Lys Leu Lys Glu Asp Ala Ser Val					
250		255			260

Lys Asp Glu Arg Lys Thr Val Ser Thr Gln Asp Tyr Thr Gly Ser  
 265 270 275  
 Asn Arg Leu Leu Ala Asn Pro Leu Glu Tyr Gly Ser Gln Ser Trp  
 280 285 290  
 Leu Phe Arg Pro Gly Trp His Leu Asp Asn Arg His Tyr Val Gly  
 295 300 305  
 Ala Val Leu Glu Arg Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met  
 310 315 320  
 Thr Val Pro Ala Tyr Phe Thr Ser Glu Asp Tyr Val Pro Gly Ser  
 325 330 335  
 Leu Lys Gly Leu Gly Lys Tyr Ser Gly Asp Asn Lys Ala Glu Arg  
 340 345 350  
 Leu Phe Val Gln Gly Glu Gly Ser Thr Leu Gln Gly Ile Gly Tyr  
 355 360 365  
 Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Arg His Thr Lys Asn Arg Tyr  
 370 375 380  
 Gly Val Glu Tyr Val Tyr His Asn Ala Asp Lys Asp Thr Trp Ala  
 385 390 395  
 Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg Gln Gly Ile Asp Leu Asp  
 400 405 410  
 Asn Arg Leu Gln Gln Thr His Cys Ser His Asp Gly Ser Asp Lys  
 415 420 425  
 Asn Cys Arg Pro Asp Gly Asn Lys Pro Tyr Ser Phe Tyr Lys Ser  
 430 435 440  
 Asp Arg Met Ile Tyr Glu Glu Ser Arg Asn Leu Phe Gln Ala Val  
 445 450 455  
 Phe Lys Lys Ala Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His Asn Leu Ser  
 460 465 470  
 Ile Asn Leu Gly Tyr Asp Arg Phe Lys Ser Gln Leu Ser His Ser  
 475 480 485  
 Asp Tyr Tyr Leu Gln Asn Ala Val Gln Ala Tyr Asp Leu Ile Thr  
 490 495 500  
 Pro Lys Lys Pro Pro Phe Pro Asn Gly Ser Lys Asp Asn Pro Tyr  
 505 510 515  
 Arg Val Ser Ile Gly Lys Thr Thr Val Asn Thr Ser Pro Ile Cys  
 520 525 530  
 Arg Phe Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro Arg Asn Ile  
 535 540 545  
 Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Ala Ala Val Gln Asp Asn Val Arg Leu  
 550 555 560  
 Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Arg  
 565 570 575  
 Ser Thr His Ser Glu Asp Lys Ser Val Ser Thr Gly Thr His Arg  
 580 585 590

Asn	Leu	Ser	Trp	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Trp
595							600						605	
Met	Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Pro	Ser
610								615					620	
Phe	Ala	Glu	Met	Tyr	Gly	Trp	Arg	Ala	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Thr
625								630					635	
Leu	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Glu	Ala	Gly	Ile
640								645					650	
Val	Phe	Lys	Gly	Asp	Phe	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Ser	Tyr	Phe	Asn
655								660					665	
Asn	Ala	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ala	Phe	Gly	Tyr	Glu	Thr	Arg	Thr
670								675					680	
Gln	Asn	Gly	Gln	Thr	Ser	Ala	Ser	Gly	Asp	Pro	Gly	Tyr	Arg	Asn
685								690					695	
Ala	Gln	Asn	Ala	Arg	Ile	Ala	Gly	Ile	Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Ile
700								705					710	
Asp	Trp	His	Gly	Val	Trp	Gly	Gly	Leu	Pro	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ser
715								720					725	
Thr	Leu	Ala	Tyr	Asn	Arg	Ile	Lys	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Ile	Arg
730								735					740	
Ala	Asp	Arg	Thr	Phe	Val	Thr	Ser	Tyr	Leu	Phe	Asp	Ala	Val	Gln
745								750					755	
Pro	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Gly
760								765					770	
Ile	Trp	Gly	Ile	Asn	Thr	Met	Phe	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ala	Lys	Ser
775								780					785	
Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ala	Leu	Leu	Asn	Gly	Asn	Ala
790								795					800	
Asn	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Arg	Pro	Trp	Tyr	Val
805								810					815	
Thr	Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Ile	Lys	Lys	His	Leu	Thr	Leu
820								825					830	
Arg	Ala	Gly	Val	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Val	Thr	Trp
835								840					845	
Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	Asn	Gln	His	Lys
850								855					860	
Asn	Val	Gly	Val	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gly	Arg	Asn	Tyr
865								870					875	
Thr	Phe	Ser	Leu	Glu	Met	Lys	Phe							
								880						

SEQ ID NO : 3

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbpl de *N. meningitidis* 2169.

Glu	Asn	Val	Gln	Ala	Gly
1				5	
Gln Ala Gln Glu Lys Gln Leu Asp Thr Ile Gln Val Lys Ala Lys					
10		15		20	
Lys Gln Lys Thr Arg Arg Asp Asn Glu Val Thr Gly Leu Gly Lys					
25		30		35	
Leu Val Lys Thr Ala Asp Thr Leu Ser Lys Glu Gln Val Leu Asp					
40		45		50	
Ile Arg Asp Leu Thr Arg Tyr Asp Pro Gly Ile Ala Val Val Glu					
55		60		65	
Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Ser Ile Arg Gly Met Asp					
70		75		80	
Lys Asn Arg Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Leu Ala Gln Ile Gln					
85		90		95	
Ser Tyr Thr Ala Gln Ala Ala Leu Gly Gly Thr Arg Thr Ala Gly					
100		105		110	
Ser Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Asn Val Lys Ala					
115		120		125	
Val Glu Ile Ser Lys Gly Ser Asn Ser Val Glu Gln Gly Ser Gly					
130		135		140	
Ala Leu Ala Gly Ser Val Ala Phe Gln Tyr Lys Thr Ala Asp Asp					
145		150		155	
Val Ile Gly Glu Gly Arg Gln Trp Gly Ile Gln Ser Lys Thr Ala					
160		165		170	
Tyr Ser Gly Lys Asn Arg Gly Leu Thr Gln Ser Ile Ala Leu Ala					
175		180		185	
Gly Arg Ile Gly Gly Ala Glu Ala Leu Leu Ile His Thr Gly Arg					
190		195		200	
Arg Ala Gly Glu Ile Arg Ala His Glu Asp Ala Gly Arg Gly Val					
205		210		215	
Gln Ser Phe Asn Arg Leu Val Pro Val Glu Asp Ser Ser Glu Tyr					
220		225		230	
Ala Tyr Phe Ile Val Glu Asp Glu Cys Glu Gly Lys Asn Tyr Glu					
235		240		245	
Thr Cys Lys Ser Lys Pro Lys Lys Asp Val Val Gly Lys Asp Glu					
250		255		260	

Arg Gln Thr Val Ser Thr Arg Asp Tyr Thr Gly Pro Asn Arg Phe  
 265 270 275  
 Leu Ala Asp Pro Leu Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Trp Leu Phe Arg  
 280 285 290  
 Pro Gly Phe Arg Phe Glu Asn Lys Arg His Tyr Ile Gly Gly Ile  
 295 300 305  
 Leu Glu His Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met Thr Val  
 310 315 320  
 Pro Ala Phe Leu Thr Lys Ala Val Phe Asp Ala Asn Ser Lys Gln  
 325 330 335  
 Ala Gly Ser Leu Pro Gly Asn Gly Lys Tyr Ala Gly Asn His Lys  
 340 345 350  
 Tyr Gly Gly Leu Phe Thr Asn Gly Glu Asn Gly Ala Leu Val Gly  
 355 360 365  
 Ala Glu Tyr Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Thr His Thr Lys  
 370 375 380  
 Ser Arg Tyr Gly Leu Glu Tyr Val Tyr Thr Asn Ala Asp Lys Asp  
 385 390 395  
 Thr Trp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg Gln Gly Ile  
 400 405 410  
 Gly Leu Asp Asn His Phe Gln Gln Thr His Cys Ser Ala Asp Gly  
 415 420 425  
 Ser Asp Lys Tyr Cys Arg Pro Ser Ala Asp Lys Pro Phe Ser Tyr  
 430 435 440  
 Tyr Lys Ser Asp Arg Val Ile Tyr Gly Glu Ser His Arg Leu Leu  
 445 450 455  
 Gln Ala Ala Phe Lys Lys Ser Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His  
 460 465 470  
 Asn Leu Ser Val Asn Leu Gly Phe Asp Arg Phe Asp Ser Asn Leu  
 475 480 485  
 Arg His Gln Asp Tyr Tyr Tyr Gln His Ala Asn Arg Ala Tyr Ser  
 490 495 500  
 Ser Lys Thr Pro Pro Lys Thr Ala Asn Pro Asn Gly Asp Lys Ser  
 505 510 515  
 Lys Pro Tyr Trp Val Ser Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Gly  
 520 525 530  
 Gln Ile Cys Leu Phe Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro  
 535 540 545  
 Arg Ser Ile Asn Gly Lys Ser Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Asp Asn  
 550 555 560  
 Val Arg Leu Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Leu Arg Tyr  
 565 570 575

Asp Tyr Arg Ser Thr His Ser Asp Asp Gly Ser Val Ser Thr Gly  
 580 585 590  
 Thr His Arg Thr Leu Ser Trp Asn Ala Gly Ile Val Leu Lys Pro  
 595 600 605  
 Ala Asp Trp Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Thr Ser Thr Gly Phe Arg  
 610 615 620  
 Leu Pro Ser Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ser Gly Val Gln  
 625 630 635  
 Ser Lys Ala Val Lys Ile Asp Pro Glu Lys Ser Phe Asn Lys Glu  
 640 645 650  
 Ala Gly Ile Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser  
 655 660 665  
 Trp Phe Asn Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Val Arg Gly Tyr Glu  
 670 675 680  
 Ala Gln Ile Lys Asn Gly Lys Glu Glu Ala Lys Gly Asp Pro Ala  
 685 690 695  
 Tyr Leu Asn Ala Gln Ser Ala Arg Ile Thr Gly Ile Asn Ile Leu  
 700 705 710  
 Gly Lys Ile Asp Trp Asn Gly Val Trp Asp Lys Leu Pro Glu Gly  
 715 720 725  
 Trp Tyr Ser Thr Phe Ala Tyr Asn Arg Val His Val Arg Asp Ile  
 730 735 740  
 Lys Lys Arg Ala Asp Arg Thr Asp Ile Gln Ser His Leu Phe Asp  
 745 750 755  
 Ala Ile Gln Pro Ser Arg Tyr Val Val Gly Leu Gly Tyr Asp Gln  
 760 765 770  
 Pro Glu Gly Lys Trp Gly Val Asn Gly Met Leu Thr Tyr Ser Lys  
 775 780 785  
 Ala Lys Glu Ile Thr Glu Leu Leu Gly Ser Arg Ala Leu Leu Asn  
 790 795 800  
 Gly Asn Ser Arg Asn Thr Lys Ala Thr Ala Arg Arg Thr Arg Pro  
 805 810 815  
 Trp Tyr Ile Val Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Thr Ile Lys Lys His  
 820 825 830  
 Phe Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr  
 835 840 845  
 Val Thr Trp Glu Asn Val Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn  
 850 855 860  
 Gln His Lys Asn Val Gly Val Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly  
 865 870 875  
 Arg Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe  
 880 885

SEQ ID NO : 4

Objet : Sequence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* 2169.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	
1				5				10	
Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Pro	Arg	Pro
					15		20		25
Ala									
Asp	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Gln	Ala	Gln
					30		35		40
Tyr	Gly	Phe	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Arg	Arg
					45		50		55
Asn									
Ala	Glu	Glu	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Asn	Glu
					60		65		70
Thr	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys	Pro	Lys	Glu	Leu
					75		80		85
Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Val	Glu	Thr	Asp	Gly
					90		95		100
Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Ser	Asn	Gln
					105		110		115
Gly	Asn	Gly	Val	Asn	Gln	Pro	Lys	Asn	Gln
					120		125		130
Asn	Phe	Gln	Tyr	Val	Tyr	Ser	Gly	Trp	Phe
					135		140		145
Ser	Glu	Lys	Asp	Phe	Ser	Asn	Lys	Ile	Lys
					150		155		160
Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	His	Gly	Glu	Lys	Pro
					165		170		175
Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile	Tyr	Lys	Gly	Val
					180		185		190
Asp	Thr	Lys	Lys	Gly	Gln	Asp	Phe	Arg	Glu
					195		200		205
Lys	Lys	Gln	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ser	Gly	Phe
					210		215		220
Glu	Glu	Tyr	Ser	Asn	Lys	Asn	Glu	Ser	Thr
					225		230		235
Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu
					240		245		250
Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn
					255		260		265

Asn	Asn	Thr	Asn	Asn	Asp	Lys	His	Thr	Thr	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Leu
							270		275					280
Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Phe	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala
							285		290					295
Thr	Asp	Lys	Lys	Glu	Asn	Glu	Thr	Lys	Leu	His	Pro	Phe	Val	Ser
							300		305					310
Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Phe	Phe	Gly	Pro	Gln	Gly	Glu
							315		320					325
Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Lys	Val	Ala	Val
							330		335					340
Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Ala
							345		350					355
Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly
							360		365					370
Thr	Ser	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Val
							375		380					385
Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Asn	Phe
							390		395					400
Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Met	Ile	Pro	Leu
							405		410					415
Leu	Pro	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ala	Asp	Lys	Gly
							420		425					430
Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Phe	Glu	His	Thr	Pro
							435		440					445
Glu	Ser	Asp	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Gly
							450		455					460
Ala	Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Thr
							465		470					475
Lys	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu
							480		485					490
Lys	Tyr	Gly	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Met	Gln
							495		500					505
Ala	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Glu	Gln	Val
							510		515					520
Glu	Gln	Ser	Met	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Lys	Glu
							525		530					535
Ile	Pro	Thr	Asp	Gln	Asn	Val	Val	Tyr	Arg	Gly	Ser	Trp	Tyr	Gly
							540		545					550
His	Ile	Ala	Asn	Gly	Thr	Ser	Trp	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Lys
							555		560					565
Glu	Gly	Gly	Asn	Arg	Ala	Glu	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Ala	Asp	Lys
							570		575					580

Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr  
585 590 595

Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly Asn Gly Phe Glu Gly Thr  
600 605 610

Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Lys Asn Thr  
615 620 625

Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Lys Gly  
630 635 640

Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala  
645 650 655

Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr Ser Ser  
660 665 670

Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys  
675 680 685

Arg Gln Gln Pro Val Gln  
690

Revendications

1. Une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention ou à l'atténuation des effets d'une infection à *Neisseria meningitidis*, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.
2. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2169.
3. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1 ou 2, qui comprend à titre d'agent thérapeutiques, au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de

100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 75 kD à 60 kD ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité d'un poids moléculaire élevé de 100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 90 kD à 80 kD .

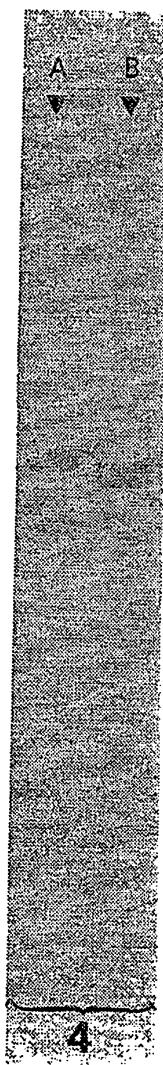
4. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 3, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93-95 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 72 kD à 65 kD.
5. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 4, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 67-70 kD environ.
6. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 5, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 100 kD environ à 95 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD à 85 kD .
7. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 6, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 98 kD environ et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD environ.
8. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la

transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.

9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
10. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 9, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.
11. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.
12. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
13. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 12, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.

14. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 13, dans laquelle lesdites première et deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et deuxième souches de *N. meningitidis* sérogroupe B.

FIG. 1



**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00905

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. <sup>5</sup> A61K 39/095; //C07K 13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. <sup>5</sup> C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 November 1990 (cited in the application) see the whole document --	1-14
A	WO, A, 8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 May 1987 see the whole document --	1-14
A	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 58, No. 9 September 1990, WASHINGTON pages 2875-2881. NIRUPAMA B. B. ET AL "expression of neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines" cited in the application, see the whole document -----	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 January 1993 (15.01.93)

Date of mailing of the international search report  
8 February 1993 (08.02.93)

Name and mailing address of the ISA/  
EUROPEAN PATENT OFFICE  
Facsimile No.

Authorized officer  
Telephon No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200905  
SA 66295

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A-	5526190	16-11-90
		US-A-	5141743	25-08-92
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-8702678	07-05-87	US-A-	4681761	21-07-87
		AU-B-	594400	08-03-90
		AU-A-	6623286	19-05-87
		EP-A-	0245433	19-11-87
		JP-T-	63502427	14-09-88
-----	-----	-----	-----	-----

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00905

**I. CLASSEMENT DE L'INVENTION** (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB.

CIB 5 A61K39/095; //C07K13/00

**II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>9</sup>**III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS<sup>10</sup>**

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 Novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	WO,A,8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 Mai 1987 voir le document en entier ---	1-14 -/-

<sup>11</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "B" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

**IV. CERTIFICATION**

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 JANVIER 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

C. 02. 93

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

FERNANDEZ Y BRA F.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>15</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	<p><b>INFECTION AND IMMUNITY</b>      vol. 58, no. 9, Septembre 1990, WASHINGTON      pages 2875 - 2881  <b>NIRUPAMA B.B. ET AL</b> 'expression of  <i>neisseria meningitidis</i> iron-regulated      outer membrane proteins, including a      70-kilodalton transferrin receptor, and      their potential for use as vaccines'      cité dans la demande      voir le document en entier        -----</p>	1-14

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200905  
SA 66295

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A-	5526190	16-11-90
		US-A-	5141743	25-08-92
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-8702678	07-05-87	US-A-	4681761	21-07-87
		AU-B-	594400	08-03-90
		AU-A-	6623286	19-05-87
		EP-A-	0245433	19-11-87
		JP-T-	63502427	14-09-88
-----	-----	-----	-----	-----

EPO FORM P072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**